



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจาก
ศูนย์อนุรักษ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

**Survey of Diseases in Juvenile Sea Turtles in
Conservation Centre, the Royal Thai Navy,
Chonburi Province**

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนาพร ชื่นอิม และคณะ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

พฤษภาคม 2552

การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

ธนาพร ขึ้นอิม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000

บทคัดย่อ

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวนทั้งหมด 65 ตัว พบบาดแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง รยางค์ บริเวณผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น ไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิ ปรสิตร หรือไข่ของพยาธิหรือ ปรสิตร อาการโรคชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบได้แก่ บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัว (ulcerative dermatitis) บาดแผลที่บริเวณกระดอง แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) ตับอักเสบ (necrotizing hepatitis) กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrextasis) ลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อจากบาดแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม heamatoxyline และ eosin พบว่าอวัยวะต่างๆ เหล่านี้มีการติดเชื้อของแบคทีเรียรูปร่างต่างๆ ได้แก่ แบบกลม (coccus) แบบแท่ง (rod) และแบบแท่งโค้ง (curved rod) ไม่พบการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา และการติดเชื้อ papillomavirus เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลไปทำการจำแนกชนิดสามารถจำแนกได้ 10 ชนิด คือ *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp. ผู้วิจัยกำลังพัฒนาเทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อบาดแผลโดยเบื้องต้นใช้ probe สำหรับการตรวจหาแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Vibrio* spp. และ *Staphylococcus aureus*

Survey of diseases in juvenile sea turtles in the conservation station at

Royal Navy Base, Chonburi Province

Thanaporn Chuen-Im

Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University

Sanamchan Place, Nakorn Pathom Thailand 73000

Abstract

To survey diseases in juvenile sea turtles died at the Sea Turtle Conservation Station, the total of 65 samples were collected during 2005 and 2007. Investigation of these turtles revealed lesions and clinical signs in both external and internal organs such as shells, flippers, tails and anuses, stomachs, intestines, and livers. No infection of parasites or parasitic eggs was observed. The diseases found in these turtles were ulcerative dermatitis, ulcerative stomatitis, necrotizing hepatitis, gastrectasis, and impacted intestines. Using TEM and histology, lesion tissues were determined and the results showed clumps of bacteria distributing in the samples. These bacteria were either Gram-positive or –negative, and either in coccus, rod, or curved rod shapes. No hyphae of fungi or papillomavirus infection, a cause of fibrinopapillomatosis, found in the tissues. Identification of bacteria isolated from the lesions results in 10 genus or species, including *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., and *Aureobacterium* spp. Fluorescence in situ hybridization (FISH) are currently developed to use for study of bacteria infection in lesion tissues. Thus far, two probe sequences are developed to use for *Vibrio* spp. and *Staphylococcus aureus*.

การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

Survey of diseases in juvenile sea turtles in conservation station at Royal Navy Base, Chonburi Province

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาพร ชื่นอิ่ม

เต่าทะเลเป็นสัตว์ทะเลที่ได้รับการคุ้มครองให้เป็นสัตว์สงวนที่ใกล้สูญพันธุ์ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ในปัจจุบันมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วและมีแนวโน้มว่าจะสูญพันธุ์ในไม่ช้าด้วยเหตุนี้กองทัพเรือจึงมีโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลเพื่อเป็นการสนับสนุนตามโครงการ “สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ ดำเนินการโดยการเก็บและเพาะฟักไข่เต่าทะเลที่บริเวณหาดหน้าบ้านเกาะครามและทำการอนุบาลลูกเต่าจนกระทั่งมีอายุ 3 เดือนขึ้นไปก่อนที่จะทำการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ ปัญหาหลักอันหนึ่งพบในการอนุบาลลูกเต่าทะเลในบ่ออนุบาล คือการเจ็บป่วยของลูกเต่า จากข้อมูลของศูนย์อนุรักษ์ของกองทัพเรือ อ. สัตหีบนั้นพบว่าอัตราการตายของลูกเต่าระหว่างการอนุบาลโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 30 - 70%

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์ฯ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวนทั้งหมด 65 ตัว (ลูกเต่าตนุจำนวน 40 ตัวและลูกเต่ากระจำนวน 25 ตัว) อายุของตัวอย่างลูกเต่าอยู่ในช่วงระหว่าง 2-3 เดือน พบบาดแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง ทรายคัมป์ บริเวณผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น จากตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิ ปรสิตร หรือไข่ของพยาธิหรือปรสิต อาการโรคชนิดต่างๆ ที่ตรวจสรุปได้ดังนี้ บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัวและที่บริเวณกระดอง (ulcerative dermatitis) แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) ตับอักเสบซึ่งบางครั้งพบอาการลามไปที่ลำไส้เล็กด้วย (necrotizing hepatitis) กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrectasis) และลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง เมื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากบาดแผลแล้วจำแนกชนิดของเชื้อสามารถจำแนกได้ถึงระดับยีนส์และสปีชีส์รวมทั้งหมด 10 ชนิดด้วยกันคือ *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp.

ข้อสันนิษฐานต่อสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้และอาจส่งผลต่อการเสียชีวิตของลูกเต่าทะเลเหล่านี้ อันหนึ่งคือ ดังที่พบในสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์ที่ในวัยทารกหรือวัยเด็กจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคต่างๆ ได้ต่ำกว่าวัยผู้ใหญ่หรือตัวเต็มวัยทำให้ลูกเต่าทะเลเหล่านี้ติดเชื้อแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมได้ง่ายส่งผลให้ป่วยเป็นโรคและหายจากโรคยากกว่าจึงตายในที่สุด เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อเปรียบเทียบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีการรายงานว่ามีมากแยกได้จากบาดแผลของเต่าทะเล (Gorge, 1997) กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ปรากฏว่าไม่มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Pseudomonas* spp. ในตัวอย่างลูกเต่าทะเลในรายงานนี้ แสดงให้เห็นว่า

ลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าเป็นเชื้อก่อโรคในเต่าทะเลในแต่ละท้องถิ่นที่อาจมีความแตกต่างกัน ดังนั้นในแต่ละท้องถิ่นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแต่มีความสำคัญต่อการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ต่อไป

การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

Survey of diseases in juvenile sea turtles in conservation station at Royal Navy Base, Chonburi Province

แหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในปัจจุบันเหลืออยู่น้อยมากทั้งในฝั่งทะเลอ่าวไทยและทางฝั่งทะเลอันดามัน การลดจำนวนลงของเต่าทะเลจนใกล้สูญพันธุ์นั้นเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกัน เช่น การทำลายหรือรบกวนบริเวณชายหาดที่แม่เต่าทะเลใช้ในการวางไข่และการลักลอบเก็บไข่เต่าไปขาย การติดตั้งเครื่องมือแยกเต่าทะเลออกจากอวนลากกุ้ง เนื่องจากในปัจจุบันเต่าทะเลมีจำนวนเหลือน้อยมาก ด้วยเหตุนี้กองทัพเรือจึงมีโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลเพื่อเป็นการสนับสนุนตามโครงการ “สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ ดำเนินการโดยการเก็บและเพาะฟักไข่เต่าทะเลที่บริเวณหาดหน้าบ้านเกาะครามและทำการอนุบาลลูกเต่าจนกระทั่งมีอายุ 3 เดือนขึ้นไปก่อนที่จะทำการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ ปัญหาหลักอันหนึ่งที่พบในการอนุบาลลูกเต่าทะเลในบ่ออนุบาล คือการเจ็บป่วยของลูกเต่า จากข้อมูลของศูนย์อนุรักษ์ของกองทัพเรือ อ.สัตหีบนั้นพบว่าอัตราการตายของลูกเต่าระหว่างการอนุบาลอยู่ที่ 30 - 70% โดยเฉพาะ จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของโครงการนี้เพื่อศึกษาและสำรวจโรคในลูกเต่าทะเลที่เสียชีวิตจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์ฯ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวนทั้งหมด 65 ตัว (ลูกเต่าตนุจำนวน 40 ตัวและลูกเต่ากระจำนวน 25 ตัว) อายุของตัวอย่างลูกเต่าอยู่ในช่วงระหว่าง 2-3 เดือน ความยาวและความกว้างของกระดองลูกเต่าส่วนด้านบนหรือด้านโค้งนั้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 5.7 – 6.4 เซนติเมตร และ 7.3 – 8.5 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบบาดแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง ไรยางค์ บริเวณผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น จากตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิ ปรสิตร หรือไข่ของพยาธิหรือปรสิตร แต่พบอาการโรคชนิดต่างๆ สรุปได้ดังนี้

- บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัว (ulcerative dermatitis) พบมากที่ผิวหนังบริเวณลำคอ ก้นและหาง ที่ปลายครีบน้้าและครีบล้าง
- บาดแผลที่บริเวณกระดอง มีลักษณะเป็นวงขาวกึ่งลึกเข้าไปในเนื้อกระดอง
- แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) พบลักษณะลิ้นอักเสบ มีหนองสีเหลืองคล้ายเนยอยู่บนลิ้น
- ตับอักเสบ (necrotizing hepatitis) พบลักษณะแผลเป็นจุดสีเขียวหรือเทากระจายอยู่ทั่วอวัยวะบางตัวอย่างตับมีลักษณะแข็งและสีเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองปนเขียว

- กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrectasis) บางครั้งมีของเหลวสีเหลืองพร้อมแก๊สขมอยู่ภายใน

- ลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง ลักษณะมีของเหลวสีเหลืองและแก๊สอัดแน่นอยู่ในภายในลำไส้ ในบางครั้งพบอาการต่อเนื่องมาจากกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ลูกเต่าทะเลบางตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติที่ตับโดยตับมีลักษณะแข็งและมีสีเหลืองปนเขียว นั่นจะมีอาการลามของโรคไปยังลำไส้เล็กส่วนที่อยู่ติดกับอวัยวะตัวอีกด้วย ลำไส้ส่วนนี้จะมีลักษณะแข็งและมีสิ่งอุดตันแน่นอยู่ภายใน

เมื่อนำเนื้อเยื่อจากบาดแผลเหล่านี้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม heamatoxyline และ eosin แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาซึ่งจากการเปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของจุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้สันนิษฐานได้ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย (มีขนาดเซลล์อยู่ในช่วงประมาณ 0.5 – 2 ไมโครเมตร) โดยพบว่าอวัยวะต่างๆ เหล่านี้มีการติดเชื้อของแบคทีเรียรูปร่างต่างๆ ได้แก่ แบบกลม (coccus) แบบแท่ง (rod) และแบบแท่งโค้ง (curved rod) อยู่ภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก ไม่พบการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในทุกเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบเบื้องต้นของการติดเชื้อ papillomavirus โดยใช้เทคนิค PCR และไพรเมอร์ L1C1/C2 ในบริเวณยีน L1 (Yoshikawa และคณะ, 1991) ผลการทดลองที่ได้ไม่มีการ amplify ขึ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าไม่มีการติดเชื้อของไวรัส

หลังจากที่ทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลโดยใช้เทคนิคการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) ตามคุณสมบัติการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียใน the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) พบเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีรูปร่างทั้งแบบกลม ท่อน และท่อนโค้ง สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียถึงระดับยีนส์และสปีชีส์ได้จากทั้งหมด 56 isolates พบชนิดเชื้อรวมทั้งหมด 10 ชนิดด้วยกัน มีดังนี้คือ *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยใช้คุณสมบัติจาก the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ได้ เป็นแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกรูปร่างท่อนและกลม และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนและกลมอีกจำนวนหนึ่ง จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อ *Vibrio alginolyticus* จากเนื้อเยื่อบาดแผลได้มากที่สุด (คิดเป็น 26.79%) เชื้อแบคทีเรียรองลงมาคือ *Staphylococcus* spp. (คิดเป็น 19.64%) เชื้อแบคทีเรียอันดับที่สามมีสองชนิด คือ *Citrobacter freundii* และ *Micrococcus* spp. (คิดเป็น 10.71%) สำหรับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่จำแนกได้ลำดับถัดมา คือ *Edwardsiella* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Aureobacterium* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus* group C และเชื้อ *Corynebacterium* spp.

ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาเทคนิค FISH สำหรับใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อ วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อต้องการประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลสำหรับการศึกษาโรคในสัตว์ที่ได้รับการอนุรักษหรือการคุ้มครองพันธุ์เช่น เต่าทะเล โดยได้ทำการสืบหาข้อมูลจากวารสารที่มีการตีพิมพ์และจาก database ทาง internet เพื่อหาลำดับเบสที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็น probe ในการทดลอง จากนั้นทำการทดสอบความเหมาะสมของลำดับเบสที่ได้แต่ละตัวกับโปรแกรมทดสอบด้วยคอมพิวเตอร์ที่ได้จากเว็บไซต์ต่างๆ เช่น probe match programme ของ ribosomal database project จาก <http://rdp.cme.msu.edu/probematch> หรือ blast programme จาก <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast> โดยได้ลำดับเบสสำหรับ probe ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทั่วไปคือ probe EUB338 และ probe สำหรับติดตามแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Vibrio* spp. และ *Staphylococcus aureus* โดยอยู่ในขั้นตอนการหาสภาวะสำหรับ hybridization ที่เหมาะสมสำหรับ probe แต่ละตัวอยู่

ข้อสันนิษฐานต่อสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้และอาจส่งผลต่อการเสียชีวิตของลูกเต่าทะเลเหล่านี้หนึ่งคือ ดังที่พบในสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์ที่ในวัยทารกหรือวัยเด็กจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคต่างๆ ได้ต่ำกว่าวัยผู้ใหญ่หรือตัวเต็มวัยทำให้ลูกเต่าทะเลเหล่านี้ติดเชื้อแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมได้ง่ายส่งผลให้ป่วยเป็นโรคและหายจากโรคนานกว่าจึงตายในที่สุด

เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อเปรียบเทียบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีการรายงานว่ามีแยกได้จากบาดแผลของเต่าทะเล (Gorge, 1997) กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ปรากฏว่าไม่มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Pseudomonas* spp. ในตัวอย่างลูกเต่าทะเลในรายงานนี้ แสดงให้เห็นว่าลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าเป็นเชื้อก่อโรคในเต่าทะเลในแต่ละท้องถิ่นอาจมีความแตกต่างกันดังนั้นในแต่ละท้องถิ่นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแต่มีความสำคัญต่อการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn., Williams and Wilkins, Baltimore.
2. George, R.H., 1997. Health problems and disease of sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), The Biology of Sea Turtles. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 363-385.
3. Yoshikawa, H., Kawana, T., Kitagawa, K., Mizuno, M., Yoshikura, H., Iwamoto, A. 1991. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. Jpn. J. Cancer Res. 82, 524-531.

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 สารเคมี และวิธีการทดลอง	9
บทที่ 3 ผลการทดลอง	14
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	54

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 บริเวณแหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในประเทศไทย	3
รูปที่ 2 กราฟแสดงช่วงเวลาวางไข่ของเต่าตนุและเต่ากระที่วางไข่ในประเทศไทย	4
รูปที่ 3 สถิติของจำนวนไข่เต่าที่เก็บได้ และอนุบาลที่ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ฯ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2541 ถึง 2547	5
รูปที่ 4 ลูกเต่าตนุและเต่ากระอายุประมาณ 1 เดือนในบ่ออนุบาลของศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี	14
รูปที่ 5 การให้อาหารลูกเต่าตนุและเต่ากระ (ซ้าย) สหรัยสีเหลือง และ (ขวา) เนื้อปลาข้างเหลืองสด	15
รูปที่ 6 อวัยวะภายในและบาดแผลที่พบบนอวัยวะของลูกเต่าตนุ	16
รูปที่ 7 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ที่พบบาดแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด	20
รูปที่ 8 เนื้อเยื่อบาดแผลมีหนองคล้ายเนยสีเหลืองในช่องปากของลูกเต่าตนุ	23
รูปที่ 9 เนื้อเยื่อ บริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 1 ย้อมด้วยสีย้อม H&E	24
รูปที่ 10 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 2 ย้อมด้วยสีย้อม H&E เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลกับเนื้อเยื่อรอบบาดแผล	26
รูปที่ 11 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่าตนุตัวที่ 1 ย้อมด้วยสีย้อม H&E	27
รูปที่ 12 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 3 ย้อมด้วยสีย้อม H&E เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อรอบบาดแผลกับเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล	28
รูปที่ 13 ผลการทดสอบความจำเพาะของ probe สำหรับการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก Trebesius และคณะ (2000) โดยการใช้ Probe Match Programme	33
รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะของ probe สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก Trebesius และคณะ (2000) โดยใช้ Blast programme	35
รูปที่ 15 ผลการทดสอบความจำเพาะของ probe สำหรับการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio spp.</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก http://bioinfo.unice.fr โดยการใช้ Probe Match Programme	39

รูปที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะของ probe สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อ แบคทีเรีย <i>Vibrio spp.</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก http://bioinfo.unice.fr โดยใช้ Blast programme	41
รูปที่ 17 การใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบแบคทีเรียในเนื้อเยื่อลูกเต๋าทะเล ตัวอย่างและแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อเยื่อตัวอย่าง	45

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การติดเชื้อแบคทีเรียในเต่าทะเล	7
ตารางที่ 2 สรุปจำนวนตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติและโรคในลูกเต่าตนุและกระจาก ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จากจำนวนทั้งหมด 65 ตัวอย่าง ระหว่าง ปีพ.ศ. 2548 ถึง พ.ศ. 2550	18
ตารางที่ 3 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลที่พบในตัวอย่างลูกเต่าตนุและ เต่ากระ	30

บทที่ 1 บทนำ

เต่าทะเลเป็นสัตว์ดึกดำบรรพ์ที่เกิดขึ้นบนโลกนี้ไม่ต่ำกว่า 130 ล้านปีก่อน การแพร่กระจายของเต่าทะเลพบอยู่เฉพาะในทะเลเขตร้อนและเขตอบอุ่น เต่าทะเลทั่วโลกพบอยู่ 8 ชนิดด้วยกัน คือ เต่ามะเฟือง (*Dermochelys coriacea*), เต่าตนุ (*Chelonia mydas*), เต่าหลังแบน (*Chelonia depressa*), เต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*), เต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*), เต่าหญ้า (*Lepidochelys olivacea*), เต่าหญ้าแอตแลนติก (*Lepidochelys kempii*) และเต่าดำ (*Chelonia agassizii*) ในประเทศไทยพบการวางไข่ของเต่าทะเลเพียง 4 ชนิด คือ

1. เต่ากระ (Hawksbill turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Eretmochelys imbricata*

ลักษณะเด่นของเต่าชนิดนี้ คือ มีหัวแคบและปากเป็นจะงอยค่อนข้างแหลมจุ่มคล้ายปากเหยี่ยว เกล็ดบนหัวตอนหน้ามี 2 คู่ เกล็ดบนหลังแถวข้างมีจำนวนข้างละ 4 เกล็ด เกล็ดกระดองหลังเรียงซ้อนกันและมีสีสลับดลวยสวยงามเป็นสีเหลือง น้ำตาลและดำ กระดองส่วนท้องมีสันจากด้านหน้าไปด้านหลัง ขาใบพายคู่หน้ามีเล็บ 2 เล็บ เต่ากระตัวโตเต็มวัยมีขนาดกระดองอยู่ในช่วง 71 – 91 เซนติเมตร (28 – 36 นิ้ว) น้ำหนัก 36 – 64 กิโลกรัม (80 – 140 ปอนด์) เต่ากระเมื่อยังมีขนาดเล็กจะอาศัยอยู่ชายฝั่งเขตนํ้าตื้นและกินสัตว์พวกฟองน้ำ สาหร่ายทะเล ปู ปลา หอย แมงกะพรุน และสัตว์จำพวกไม่มีกระดูกสันหลังเป็นอาหาร พบการแพร่กระจายทั่วไปในเขตรวมหาสมุทรแปซิฟิก และมหาสมุทรแอตแลนติก

2. เต่าตนุ (Green turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chelonia mydas*

ลักษณะเด่นของเต่าตนุ คือ เกล็ดบนส่วนหัวตอนหน้า (prefrontal scale) มีจำนวน 1 คู่ เกล็ดบนกระดองข้าง (coastal scale) มีจำนวน 4 เกล็ด กระดองหลังเรียบและมีเกล็ดสันหลังขนาดเล็กกว่าแผ่นเกล็ดชายโครง แผ่นเกล็ดขอบกระดองมีขนาดเล็ก ลักษณะของเกล็ดจะเชื่อมต่อกันไม่ซ้อนกัน สีสันและลวดลายสวยงาม โดยกระดองมีสีน้ำตาลอมเหลืองมีลายสีจางกว่ากระจายจากส่วนกลางเกล็ด จึงมีอีกชื่อว่า เต่าแสงอาทิตย์ เมื่อโตเต็มที่วัดกระดองได้ 90 – 100 เซนติเมตร (36 – 43 นิ้ว) น้ำหนักประมาณ 113 – 182 (250 - 300 ปอนด์) เต่าตนุเป็นเต่ากระดองแข็งประเภทที่ใหญ่ที่สุด เต่าตนุกินพืชเป็นอาหารโดยเฉพาะสาหร่ายและหญ้าทะเล เต่าตนุในวัยอ่อนจะกินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร แหล่งวางไข่ของเต่าตนุพบมากในอ่าวไทย และพบประปรายทางฝั่งทะเลอันดามัน

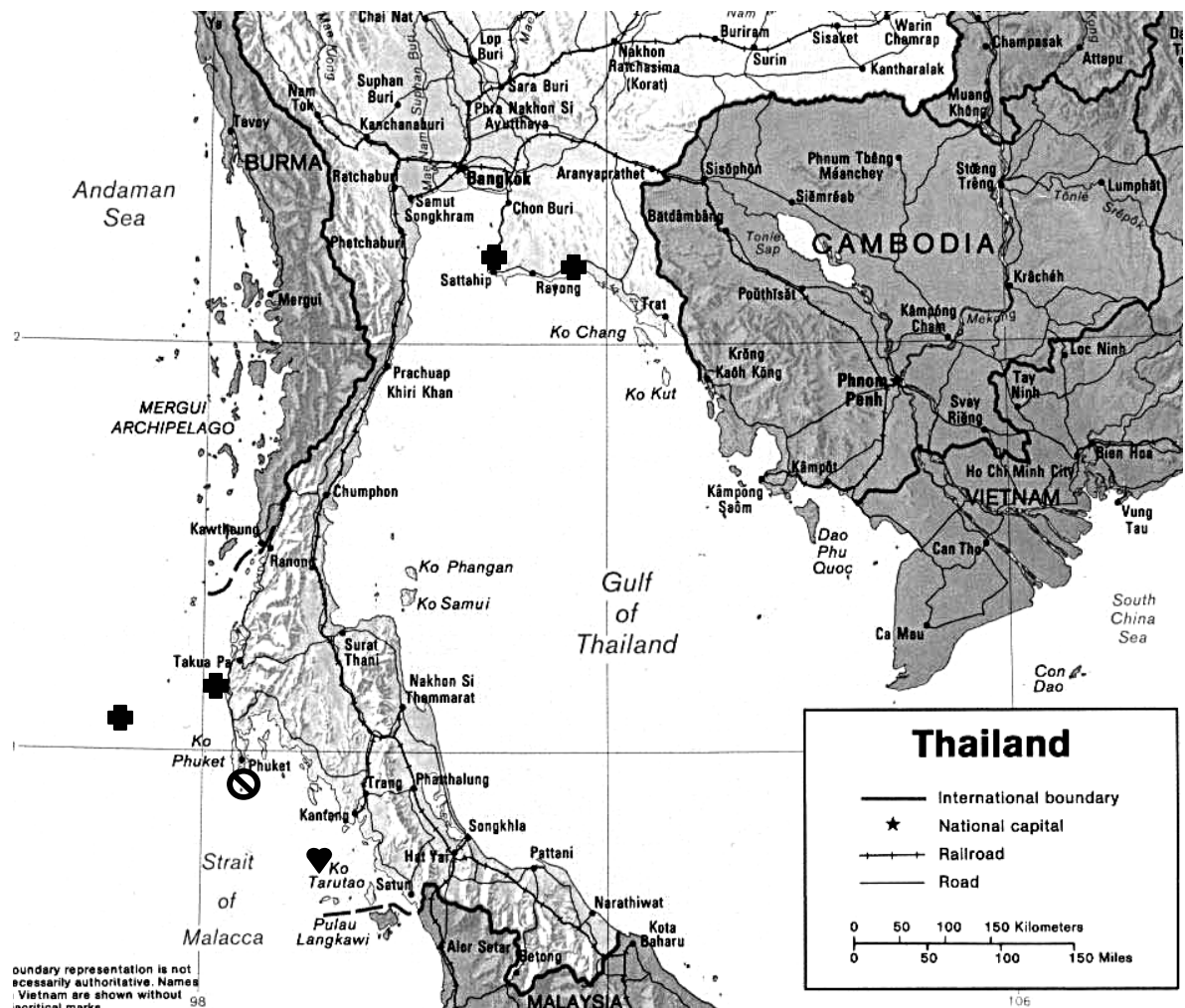
3. เต่าหญ้า (Olive ridley turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lepidochelys olivacea*

ลักษณะเด่นของเต่าหญ้า คือ กระดองเรียบสีเทาอมเขียว สีของกระดองไม่ค่อยสวย จะอวยปากจะมนมากกว่าเต่าตนุ สิ่งที่แตกต่างจากเต่าตนุอย่างชัดเจนคือเกล็ดบนส่วนหัวตอนหน้ามีจำนวน 2 คู่ และเกล็ดบนกระดองหลังแถวข้างมีจำนวน 6 – 8 แผ่น นอกจากนี้ลักษณะพิเศษของเต่าหญ้ายังมีอีกอย่างคือมีกระดองส่วนท้องแถวกลาง (inframarginal scale) มีรูสำหรับขับถ่ายหรือรูเปิดสำหรับประสาทรับความรู้สึก จำนวน 5 คู่ กระดองมีสีน้ำตาลโอลีฟ ส่วนท้องสีเหลืองออกขาว เต่าหญ้าเป็นเต่าที่มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อโตเต็มที่วัดขนาดกระดองได้ 58 – 66 เซนติเมตร (23 – 26 นิ้ว) น้ำหนัก 36 – 41 กิโลกรัม (80 – 90 ปอนด์) เต่าหญ้ามักจะอวยปากใหญ่คมและแข็งแรงสำหรับขบกัดหอยที่มีเปลือกหุ้มจึงสามารถกินกุ้ง แมงกะพรุน ปู ปลา หอยสาหร่าย และหญ้าทะเล เป็นอาหารได้ แหล่งวางไข่ของเต่าหญ้าพบมากทางชายฝั่งทะเลอันดามัน ตามชายฝั่งของจังหวัดภูเก็ต พังงา และหมู่เกาะต่าง ๆ

4. เต่ามะเฟือง (Leatherback turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dermochelys coriacea*

เต่ามะเฟืองเป็นเต่าทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาเต่าทะเลทั้งหมดและสามารถจำแนกได้ง่ายที่สุด ทั้งนี้เต่ามะเฟืองไม่มีเกล็ดคลุมบนกระดอง มีเพียงแผ่นหนังสีดำหุ้มกระดองไว้เท่านั้นกลางหลังยังเห็นเป็นสันนูนขึ้นมา 7 สัน ขนาดกระดองของเต่ามะเฟืองตัวโตเต็มที่วัดได้ 150 – 178 เซนติเมตร (60 – 70 นิ้ว) น้ำหนัก 320 – 590 กิโลกรัม (710 – 1,300 ปอนด์) ส่วนมากเต่ามะเฟืองชอบหากินอยู่ในทะเลลึก ยกเว้นช่วงฤดูผสมพันธุ์ จึงพบเต่ามะเฟืองเป็นกลุ่มเล็ก ๆ เข้ามาหากินบริเวณชายฝั่ง อาหาร ได้แก่ แมงกะพรุน ทุเรียนทะเล กุ้ง ปู และปลา ที่หาได้ในบริเวณนั้นเพราะว่าเต่ามะเฟืองมีชั้นผิวหนังหนาและไขมันมากทำให้สามารถอยู่ในน้ำที่เย็นจัดได้นานกว่าเต่าทะเลชนิดอื่น จึงมีการแพร่กระจายไปทั่วโลกได้กว้างกว่าเต่าทะเลชนิดอื่น ๆ

แหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในประเทศไทยนั้น (รูปที่ 1) เต่าตนุและเต่ากระจะพบการวางไข่ทั้งสองชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยในฝั่งอ่าวไทย (Gulf of Thailand) นั้น พบการวางไข่ของเต่าทั้งสองชนิดมากบนชายหาดของเกาะคราม เกาะอีร้า เกาะจาน จ. ชลบุรี และเกาะมันใน จ. ระยอง ส่วนในฝั่งทะเลอันดามันนั้นพบการวางไข่มากที่บริเวณชายหาดของเกาะหุยง หมู่เกาะสุรินทร์ จ. พังงา สำหรับเต่ามะเฟืองและเต่าหญ้ายังพบการวางไข่ในฝั่งทะเลอันดามันเท่านั้น โดยแหล่งวางไข่ของเต่ามะเฟืองที่พบบ่อยคือที่บริเวณชายหาดท้ายเหมือง อุทยานแห่งชาติหาดท้ายเหมือง - เขาลำปี จ. พังงา และในหมู่เกาะตะรุเตา ส่วนเต่าหญ้านั้นในอดีตพบการวางไข่มากที่ จ. ภูเก็ต แต่ปัจจุบันพบการวางไข่ของเต่าชนิดนี้น้อยมากในประเทศไทย



รูปที่ 1 บริเวณแหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในประเทศไทย

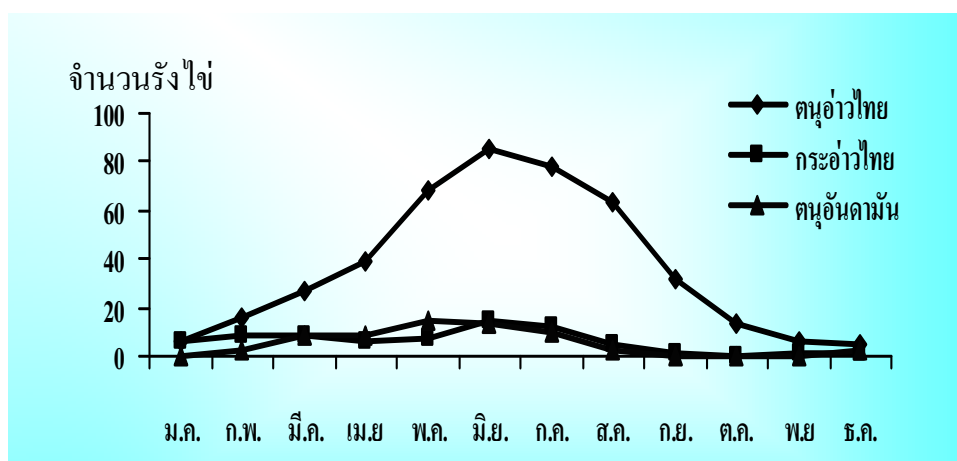
⬛ แหล่งวางไข่ของเต่าตนุและเต่ากระ, Ⓡ แหล่งวางไข่ของเต่ามะเฟือง, ♥ แหล่งวางไข่ของเต่าหญ้า

การอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

เนื่องจากจำนวนของเต่าทะเลในท้องทะเลมีการลดลงอย่างมากส่งผลให้เกิดการรวมตัวของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญด้านเต่าทะเลของโลกขึ้นเมื่อปี พ.ศ.2512 ในรูปแบบของสหพันธ์นานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union of Conservation of Nature) และในปี 2518 ได้มีการทำสนธิสัญญาการค้าสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ระหว่างประเทศขึ้น (Convention of International Trade in Endangered Species, CITES) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาถึงชีววิทยาและนิเวศวิทยา

ของเต่าทะเล เพื่อให้เกิดความเข้าใจและมีประสิทธิภาพในการวางมาตรการอนุรักษ์และป้องกันการลดจำนวนของเต่าทะเล

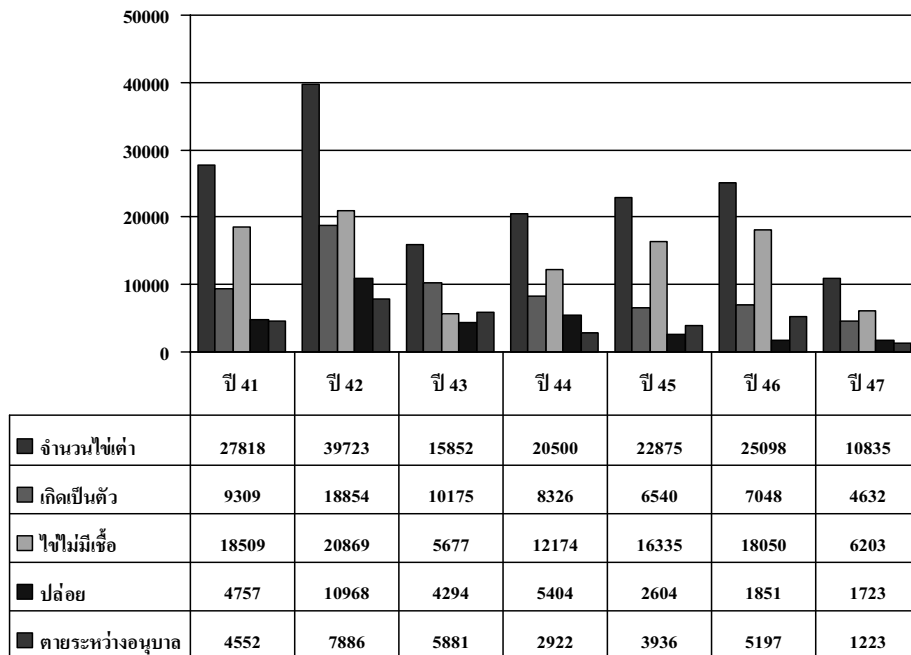
สำหรับประเทศไทยนั้น มีหลายหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนทำการรณรงค์และพัฒนาโครงการและกิจกรรมต่างๆ เพื่อการอนุรักษ์เต่าทะเลอย่างจริงจัง ทั้งนี้ กองทัพเรือซึ่งเป็นหนึ่งหน่วยงานได้จัดทำโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลโดยจัดตั้งศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลขึ้น โดยมีศูนย์อนุรักษ์อยู่ทั้งหมด 2 แห่ง คือ ที่หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี และ กองเรือภาคที่ 2 ฐานทัพเรือพังงา จ.พังงา การดำเนินงานอนุรักษ์เต่าทะเลทำโดยทำการดูแลคุ้มครองแหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในธรรมชาติ การรวบรวมและเพาะฟักไข่เต่าทะเล จากนั้นทำการอนุบาลลูกเต่าทะเล ก่อนที่จะปล่อยกลับสู่ทะเล



รูปที่ 2 กราฟแสดงช่วงเวลาวางไข่ของเต่าตนุและเต่ากระที่วางไข่ในประเทศไทย

ที่มา: ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี

จากกราฟแสดงในรูปที่ 2 จะเห็นว่าช่วงเวลาวางไข่ของแม่เต่าทะเลทั้งเต่าตนุและเต่ากระครอบคลุมระหว่างช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายนของทุกปีในทั้งสองชายฝั่งทะเลของประเทศ ซึ่งปัจจุบันนี้ศูนย์อนุรักษ์ฯ สามารถดำเนินการเพาะฟักและอนุบาลลูกเต่าตนุและเต่ากระ รวมถึงปล่อยกลับสู่ท้องทะเลได้ผลสำเร็จโดยสามารถปล่อยลูกเต่ากลับสู่ท้องทะเลได้สูงถึง 10,000 ตัว ในปี พ.ศ. 2542 (รูปที่ 3) คิดเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไข่เต่าทะเลที่มีการวางไข่ทั้งหมด อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมาจำนวนของลูกเต่าทะเลที่ฟักไข่และรอดชีวิตจนกระทั่งถูกปล่อยกลับสู่ท้องทะเลนั้นมีจำนวนลดลงเหลือไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุหนึ่งของจำนวนที่ลดลงนี้ คือ การตายระหว่างการอนุบาล โดยพบว่าลูกเต่าจำนวนมากมีบาดแผลและมีการติดเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 3 สถิติของจำนวนไข่เต่าที่เก็บได้ และอนุบาลที่ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ฯ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2541 ถึง 2547

ที่มา: ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี

โรคชนิดต่างๆ ที่พบในเต่าทะเล

การศึกษาถึงโรคที่พบในเต่าทะเลในประเทศไทยนั้นยังมีน้อยมากซึ่งจากรายงานของศูนย์ต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่งหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาชายฝั่ง ปี พ.ศ. 2527 นั้นพบว่าโรคที่เกิดกับเต่าทะเลและลูกเต่าทะเล เช่น

- โรคหนองในคอและจมูก โดยลูกเต่าจะมีอาการไม่ค่อยกินอาหารและไม่ว่ายน้ำ คอแข็ง ผิดปกติ เมื่ออ้าปากลูกเต่าจะพบหนองในคอ หรือ มีกลิ่นหนองไหลออกมา ถ้าเป็นมากจะพบหนองบริเวณโพรงจมูก ในปากและคอ โดยจะเห็นหนองเป็นก้อน
- โรคแผลบนกระดองและบริเวณผิวหนัง มักเกิดจากความหนาแน่นของลูกเต่าที่เลี้ยงอยู่ภายในบ่อเลี้ยงทำให้ลูกเต่าเกิดอาการเครียด เมื่อให้อาหารไม่เพียงพอจึงทำให้ลูกเต่าแย่งอาหารและกัดกัน มักเกิดกับลูกเต่าอายุประมาณ 2 เดือนขึ้นไป
- โรคเชื้อรา ลักษณะอาการคือที่บริเวณกระดองลูกเต่าและผิวหนังภายนอก มีลักษณะเป็นจุดขาว ๆ สังเกตเห็นได้ชัดเจน

- โรคตัวลอยและถ่ายไม่ออก ลูกเต่าจะดำน้ำไม่ลง ตัวลอย บางตัวเกิดการเสียศูนย์ขณะว่ายน้ำ ไม่กินอาหาร น้ำหนักเริ่มลดลง ขับถ่ายไม่ออก

การสำรวจโรคในเต่าทะเลชนิดต่างๆ ที่มีการรายงานในต่างประเทศทั้งเต่าทะเลที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติและที่มีการเพาะเลี้ยงไว้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงเต่าทะเลหรือในพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำนั้น พบว่ามีสาเหตุทั้งจากเชื้อจุลินทรีย์ ปรสิต และที่ไม่ใช่เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ การติดเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีพบทั้งการติดเชื้อไวรัส รา และแบคทีเรีย โดยโรคเนื่องจากเชื้อไวรัสมีดังนี้

- โรค grey-patch (Haines และคณะ, 2005) พบที่ผิวหนังบริเวณคอ และครีบ และอาจพบบริเวณหนังตา บริเวณบาดแผลจะมีสีเทา มีเชื้อไวรัสสาเหตุคือ herpes-type viruses

- โรค lung-eye-trachea (LETD) (Coberley และคณะ, 2002) มีสาเหตุมาจากเชื้อ lung-eye-trachea disease-associated herpesviruses (LETV)

- โรค fibropapillomatosis (Greenblatt และคณะ, 2005) เกิดเป็นเนื้องอกขึ้นบริเวณผิวหนังที่นุ่ม เช่น คอ คาง ปาก ตา ครีบ และบริเวณหาง เกิดจากเชื้อ fibropapilloma-associated turtle herpesviruses (FPTHV)

สำหรับการติดเชื้อรานี้มีการรายงานถึงการติดเชื้อ *Colletotrichum acutatum* ในเต่า Kemp's ridley (Manire และคณะ, 2002) เมื่อศึกษาเมดเลือดแดงโดยย้อมด้วย RapiDiff จะพบแควคิวิลจำนวนมากในไฮโดพลาสซึม นอกจากนี้ยังพบอาการอักเสบของตับและไต และมีอาการปอดบวมรวมด้วย เมื่อทำการแยกเชื้อราในอาหาร Sabouraud dextrose agar และ broth (SAB) พบรา *C. acutatum* ที่มีการสร้างเส้นใย สร้าง conidium โดยบริเวณรอบ colony จะเปลี่ยนเป็นสีส้มภายใน 7 วัน หลังจากมีสี light rust เกิดขึ้น

โรคติดเชื้อแบคทีเรียในเต่าทะเลนั้นเป็นโรคที่มีการรายงานมากที่สุดโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเต่าทะเลที่ป่วยและตายนั้นมีจำนวนมากดังสรุปในตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียที่รายงานเหล่านี้บางชนิดเป็นแบคทีเรียจำพวก saprophyte หรือ normal flora ที่พบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ บางชนิดเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ในสัตว์น้ำ ซึ่งปัจจุบันนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ากลไกในการก่อให้เกิดโรคในเต่าทะเลนั้นเป็นอย่างไร นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่แยกได้จากตัวอย่างสัตว์ที่ป่วยนั้นอาจเป็นการติดเชื้อแบบฉวยโอกาสซึ่งอาจไม่ใช่สาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริงของสัตว์ก็ได้

ตารางที่ 1 การติดเชื้อแบคทีเรียในเต่าทะเล

อวัยวะ	เชื้อ	ลักษณะอาการ	เอกสารอ้างอิง
กระเพาะอาหาร	<i>Proteus</i> sp., <i>Vibrio alginolyticus</i> , และ <i>Staphylococcus</i> spp.	เกิดการอักเสบ และเนื้อเยื่อตาย	Oros และคณะ, 2005
ลำไส้	แบคทีเรียทั้งแกรมลบ และ แบคทีเรียแกรมบวก เช่น <i>Bacillus</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Pasteurella</i> spp. <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. และ <i>V. alginolyticus</i>	เกิดการอักเสบ เยื่อเมือกอักเสบ และเนื้อเยื่อตาย	Oros และคณะ, 2005
ตับ	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Citrobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. และ <i>V. alginolyticus</i>	เกิดการอักเสบ	Oros และคณะ, 2005
เลือด	<i>Vibrio</i> spp.	โรคผิวหนังในเต่าหัวสั้น การ อักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจในเต่า มะเฟือง เยื่อเมือกในช่องจมูก อักเสบ ปอดบวม เยื่อเมือกใน ปากอักเสบ และ เลือดเป็นพิษ ใน เต่าตนุ	Wiles และRand, 1987; Obendorf และคณะ, 1987 ; Glazebrook และCampbell, 1990a,b
	<i>A. hydrophila</i> และ <i>Pseudomonas</i> spp.	ผิวหนังอักเสบ เยื่อเมือกในปาก อักเสบ เยื่อเมือกในช่องจมูกอักเสบ ปอดบวม ไชกระดูกอักเสบ และ เลือดเป็นพิษในเต่าตนุ	Glazebrook และ Campbell, 1990a,b

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อสำรวจโรคหรืออาการผิดปกติในลูกเต่าทะเลที่เสียชีวิตจาก ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม H&E แล้วสังเกตลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และการใช้เทคนิคด้านจุลชีววิทยาเพื่อแยก เชื้อจุลินทรีย์และจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จะถูกใช้เป็นข้อมูล พื้นฐานในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลต่อไป

บทที่ 2 สารเคมี และวิธีทดลอง

2.1 สารเคมี

Absolute alcohol

Potato Dextrose Agar (PDA)

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Broth (NB)

Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS)

NaCl

Gram stain reagents

Saturated picric acid

40%formalin

Glacial acetic acid

Glycerol

xylene

พาราฟินเหลว

น้ำยา coarse abrasive

น้ำยา fine abrasive

เจลาติน

สีย้อม Hematoxylin

สีย้อมEosin

lithium carbonate

DPX

2.5% glutraaldehyde

phosphate buffer pH 7.2

1% osmium tetroxide (OsO_4)

propylene oxide

epoxy resin

5% ยูเรนิลอะซิเตต (UO_2) ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂.2H₂O

เลดซีเทรต $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7).3\text{H}_2\text{O}$

2.2 วิธีทดลอง

2.2.1 การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อบาดแผลด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยา

1. ทำการวัดขนาดกระดองของลูกเต่าตัวอย่างก่อนทำการตรวจสอบบาดแผลที่ปรากฏทั้งบาดแผลภายในและภายนอก
2. ทำการล้างชิ้นเนื้อที่ต้องการเก็บตัวอย่างด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ เช็ดให้แห้ง แล้วใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดชิ้นเนื้อของลูกเต่าที่บริเวณบาดแผล
3. ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บบริเวณบาดแผลที่ปรากฏ นำมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ NA + 1 และ 3% NaCl
4. บ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 25°C สังเกตผลการทดลองทุกวัน แล้วทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการย้อมแกรมและการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เก็บเชื้อใน 15% glycerol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C
5. ทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อ (identification) โดยใช้ selective media และ เทคนิคด้าน biochemical test จาก the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

2.2.2 การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยการย้อมด้วยสีย้อม heamatoxylin และ eosin

1. ตัดชิ้นเนื้อของลูกเต่าที่มีบาดแผลในข้อ 1 (จาก 2.2.1 การจำแนกเชื้อสาเหตุที่ก่อโรคในลูกเต่าทะเลและการเก็บดองเนื้อเยื่อ) แช่ใน Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ล้าง Bouin's fluid ออกจากเนื้อเยื่อของลูกเต่าด้วย 70% แอลกอฮอล์ จนกระทั่งหมดสีเหลืองของ picric acid
3. เก็บเนื้อเยื่อของลูกเต่าใน 70% แอลกอฮอล์ เพื่อศึกษาด้านมิถุนวิทยาต่อไป
4. นำเนื้อเยื่อของลูกเต่าใน 70% แอลกอฮอล์จากข้อ 3.2.3 แช่ใน 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้งๆ ละ 2 ชั่วโมง
5. แช่ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง ก่อนผ่านขั้นตอนเพื่อเตรียมเนื้อเยื่อก่อนฝังลงในพาราฟิน
6. ทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบ rotary microtome ด้วยความหนา $5\text{ }\mu\text{m}$ ลอยชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ในอ่างลอยเนื้อเยื่อควบคุมอุณหภูมิ นำสไลด์ซ้อนชิ้นเนื้อเยื่อขึ้นเรียงน้ำทั้งบนกระดาษซับ
7. นำสไลด์เนื้อเยื่ออบให้แห้งที่ 60°C นาน 45 นาที
8. ทำการย้อมสีเนื้อเยื่อ ด้วยสี hematoxylin และ eosin
9. ศึกษาสไลด์ เนื้อเยื่อถาวรลูกเต่าทะเลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.3 การศึกษาเนื้อเยื่อบาดแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

(Transmission electron microscope; TEM)

1. นำชิ้นตัวอย่างล้างของเหลวออกด้วยบัฟเฟอร์ 0.1M phosphate buffer pH 7.2 แล้งคงสภาพตัวอย่างด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.2 นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ก่อนที่จะแช่ในน้ำยาคงสภาพตัวที่สองคือ 1% osmium tetroxide (OsO_4) ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 2 ชั่วโมงแล้วล้างตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์

2. ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับดังนี้ 30, 50, 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแช่ตัวอย่างใน propylene oxide นาน 20 นาที ทำทั้งหมด 3 ครั้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วแช่ชิ้นตัวอย่างในของเหลวผสมที่มี epoxy resin อยู่กับ propylene oxide เพื่อให้ epoxy resin ค่อยๆแทรกซึมเข้าไปในตัวอย่างได้ดี แล้วทำการระเหย propylene oxide ระเหยออกให้หมด ก่อนที่จะฝังชิ้นตัวอย่าง (embedding) ลงใน pure epoxy resin

3. เมื่อ pure epoxy resin แข็งตัวให้ตัดแต่ง block ตัวอย่างให้ได้ให้ได้ความหนา 60-90 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไมโครทอม (ultra microtome) แล้วทำการย้อมตัวอย่างด้วย 5% ยูเรนิลอะซิเตต (UO_2) ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) $_2$ ·2H $_2$ O และเลดซิเตรต $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ·3H $_2$ O เพื่อเพิ่มความเปรียบต่าง (contrast) และตัวอย่างนำไฟฟ้าได้ดี ก่อนศึกษาตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านที่ 20 kV.

2.2.4 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อบาดแผลและการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการทดสอบด้านชีวเคมี (biochemical tests)

1. ล้างชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ต้องการศึกษาด้วยบัฟเฟอร์ 0.1M phosphate buffer pH 7.2 ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ซับให้สะอาดด้วยผ้าก๊อซที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

2. ตัดชิ้นเนื้อด้วยกรรไกรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบริเวณบาดแผล

3. ทำการ swab เนื้อเยื่อตัวอย่างบริเวณส่วนตัดขวางเนื้อเยื่ออย่างระมัดระวังโดยไม่ให้มีการแตะส่วนอื่นเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ แล้ว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ได้แก่ NA และ PDA ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการเกลือในการเจริญ (Glazebrook และ Campbell, 1990ก)

4. ทำการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°C และตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์หลังการเพาะเชื้อ 24°C และทุกวันเป็นเวลา 3 วัน

5. ในการกรณีของแบคทีเรียและยีสต์ซึ่งมีการเจริญของจุลินทรีย์เป็นโคโลนีเหมือนกันจะทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการความแตกต่างด้านลักษณะ ขนาด สีของโคโลนี และการย้อมติดสีแกรมของจุลินทรีย์

6. จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีวเคมีด้วย biochemical tests ตามหลักเกณฑ์ใน the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) เช่น การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆในการเจริญ การหมักน้ำตาล การเจริญบนอาหาร O/F การทดสอบ IMViC การย่อยสลายเจลาติน การเจริญบนอาหาร TSI และการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ urease การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ catalase การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ oxidase การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ความต้องการเกลือในการเจริญเติบโตและความสามารถในการทนเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตส เป็นต้น

2.2.5 ศึกษาและพัฒนาเทคนิคในการตรวจหาการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะติดเชื้อสาเหตุก่อโรค ด้วยวิธี *in situ* hybridisation

2.2.5.1 การตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการตรึงบนสไลด์

1. ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 คืนโดยเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส
2. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียแล้วทิ้งส่วนน้ำใส เก็บส่วนตะกอนเซลล์ไว้
3. ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย PBS buffer โดยการดูดไปเปิดขึ้นลงหลายครั้ง ก่อนที่จะทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์
4. ดูดส่วน PBS buffer ทิ้งไป แล้วล้างตะกอนเซลล์ดังข้อ 3. อีกครั้ง
5. ทำการ fix เซลล์ใน 4% paraformaldehyde 1 ชั่วโมง แล้วถ่าย paraformaldehyde ออกเติม 70% EtOH ปั่นไว้ 30 นาที จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ในส่วนผสม EtOH:PBS ที่อัตราส่วน 1:1
6. หยดสารละลายเซลล์ 1 ไมโครลิตรลงบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง
7. ทำการดื่มน้ำออกโดยใช้ ethanol series grade (50%, 80%, และ 98%) เก็บสไลด์ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน
8. สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกย่อยผนังเซลล์ด้วย lysozyme (1 mg/ml ใน 10 mM Tris-HCl pH 8.0) นาน 15 นาที และ lysostaphin (10 ug/ml ใน 10 mM Tris-HCl pH 8.0) นาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย ethanol series grade ก่อนทำ hybridization
9. สำหรับแบคทีเรียแกรมลบทำ hybridize กับ probe ได้โดยไม่ต้องผ่านการย่อยด้วย lysozyme

10. ปล่อยให้สไลด์แห้งแล้วเติม hybridization buffer 10 ไมโครลิตร (0.9 M NaCl; 0.02 M Tris-HCl pH 8.0; 0.01% SDS; 20% formamide) พร้อม probe ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ng/ml (ลำดับเบสของ probe ที่ใช้แสดงในตารางที่ 2) บ่มที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 1.30 ชั่วโมง
11. ทำการล้าง probe ส่วนเกินออกด้วย washing buffer (0.225 M NaCl; 0.02 M Tris-HCl; 0.01% SDS) บ่มนาน 15 นาทีที่ 48 องศาเซลเซียส
12. ย้อมยีนโนมด้วย DAPI นาน 5 นาที

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ probe ที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

probe	ลำดับเบส	ที่มา
<i>Staphylococcus</i> spp.	5'-TCC TCC ATA TCT CTG CGC-3'	Trebesius และคณะ, 2000
<i>Vibrio</i> spp.	5'-AGG CCA CAA CCT CCA AGT AG-3'	http://bioinfo.unice.fr
(16s rRNA) EUB338	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	Amann และคณะ, 1990

บทที่ 3 ผลการทดลอง

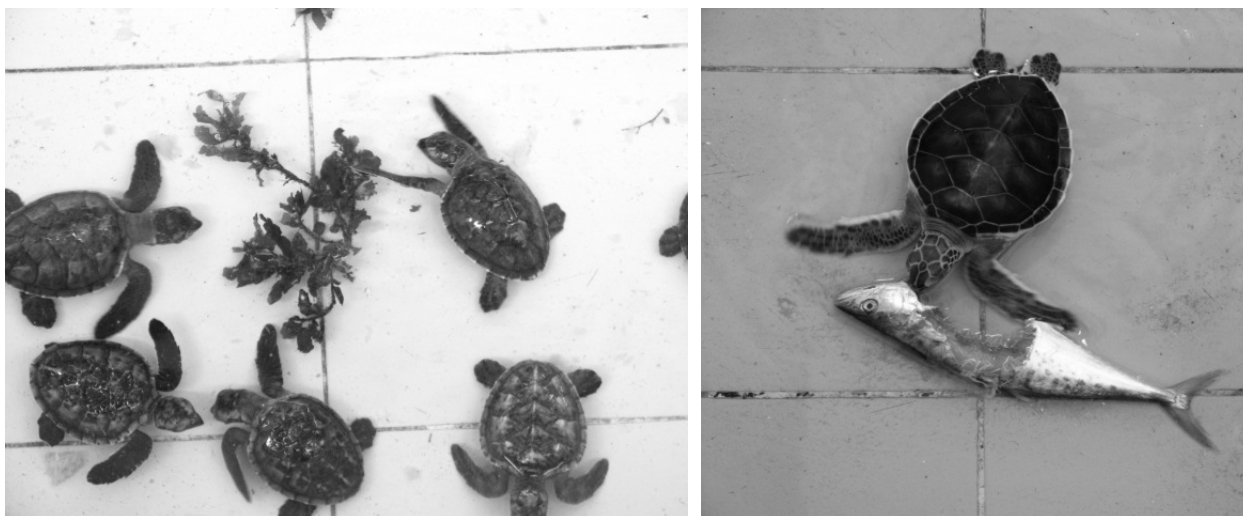
3.1 การอนุบาลลูกเต่าทะเลในศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

การดำเนินโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลของหน่วยหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง นั้น จะทำการเก็บไข่เต่าที่แม่เต่าวางไข่ไว้ตามเกาะต่างๆ ในเขต อ. สัตหีบ ซึ่งอยู่ภายใต้การดูแลของกองทัพอากาศซึ่งไข่เต่าส่วนมากจะได้มาจากเกาะคราม จากนั้นทำการเพาะฟักไข่จนกระทั่งเกิดเป็นลูกเต่าแล้วอนุบาลไว้ในบ่อเต่าของศูนย์อนุรักษ์ (รูปที่ 4) จนกระทั่งลูกเต่าอายุประมาณ 3-6 เดือนก็จะทำการปล่อยกลับคืนสู่ท้องทะเล

ในการอนุบาลลูกเต่านั้นจะให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน อาหารส่วนใหญ่เป็นเนื้อปลาข้างเหลือง และบางครั้งอาจมีเนื้อปลาหมึกผสมด้วย (รูปที่ 5) เจ้าหน้าที่จะเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อ 1 ครั้งต่อวัน โดยใช้น้ำทะเลที่บริเวณศูนย์อนุรักษ์ โดยจะทำความสะอาดบ่อหลังอาหารเข้าก่อนเติมน้ำทะเลใหม่ลงสู่บ่อเต่า นอกจากนี้หากในช่วงระหว่างวันหากน้ำทะเลในบ่ออนุบาลมีความขุ่นมาก เจ้าหน้าที่จะถ่ายน้ำออกครึ่งหนึ่งแล้วเติมน้ำทะเลกลับให้มีระดับเท่าเดิมเพื่อรักษาน้ำภายในบ่อไม่ให้มีการเน่าเสีย



รูปที่ 4 ลูกเต่าตนุและเต่ากระอายุประมาณ 1 เดือนในบ่ออนุบาลของศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี

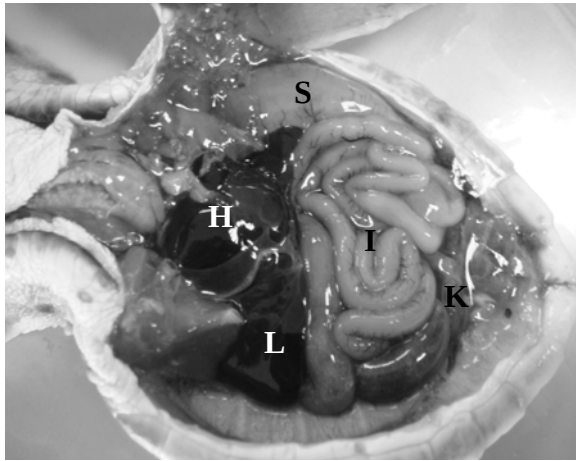


รูปที่ 5 การให้อาหารลูกเต่าตนุและเต่ากระ (ซ้าย) สำหรับยี่สือเหลือง และ (ขวา) เนื้อปลา ข้างเหลืองสด

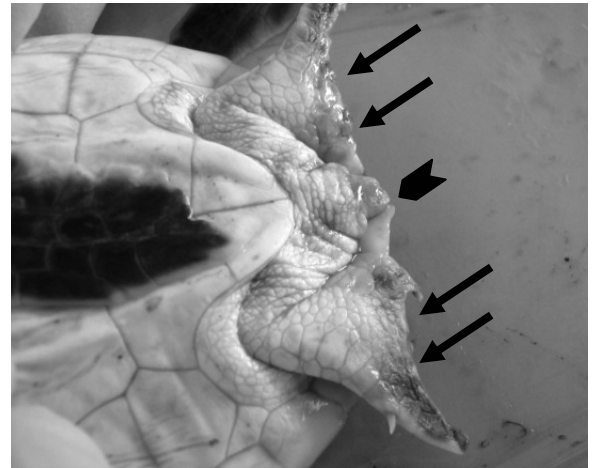
3.2 การสำรวจโรคในลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์ฯ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวน ทั้งหมด 65 ตัว (ลูกเต่าตนุจำนวน 40 ตัวและลูกเต่ากระจำนวน 25 ตัว) อายุของตัวอย่างลูกเต่าอยู่ในช่วงระหว่าง 2-3 เดือน ความยาวและความกว้างของกระดองลูกเต่าส่วนด้านบนหรือด้านโค้งนูน มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 5.7 – 6.4 เซนติเมตร และ 7.3 – 8.5 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อทำการ ตรวจสภาพแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง ไรยางค์ บริเวณ ผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล (รูปที่ 6 ก) เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น จากตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิ ปรสิตร หรือไข่ของพยาธิหรือปรสิต แต่พบอาการโรคชนิดต่างๆ สรุปได้ดังนี้

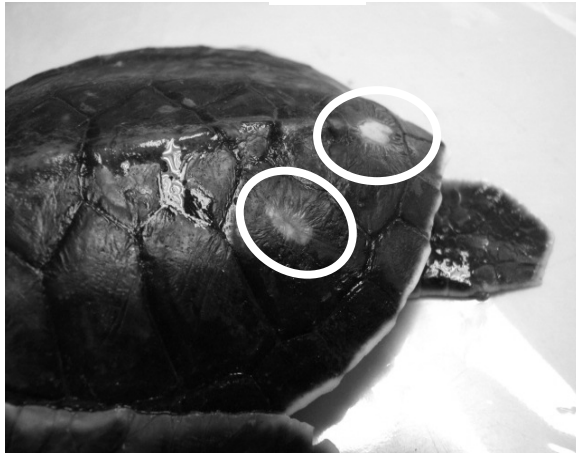
- บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัว (ulcerative dermatitis) พบมากที่ ผิวหนังบริเวณลำคอ ก้นและหาง ที่ปลายครีบหน้าและครีบหลัง (รูปที่ 6ข)
- บาดแผลที่บริเวณกระดอง มีลักษณะเป็นวงขาวกินลึกเข้าไปในเนื้อกระดอง (รูปที่ 6ค)
- แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) พบ ลักษณะลิ้นอักเสบ มีหนองสีเหลืองคล้ายเนยอยู่บนลิ้น (รูปที่ 6 ง)
- ตับอักเสบ (necrotizing hepatitis) พบลักษณะแผลเป็นจุดสีเขียวยหรือเทากระจายอยู่ ทั่วอวัยวะ บางตัวอย่างตับมีลักษณะแข็งและสีเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองปนเขียว (รูปที่ 6 จ)



ก



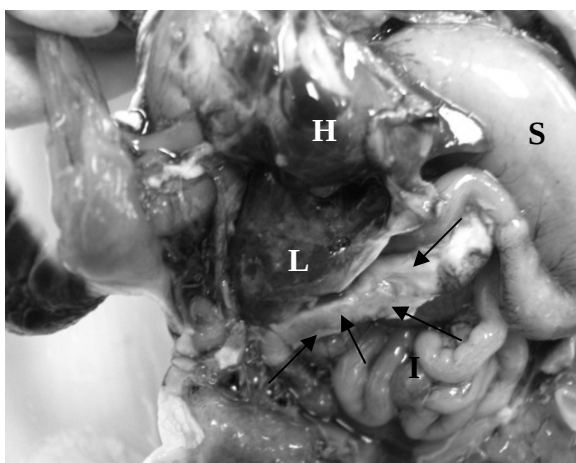
ข



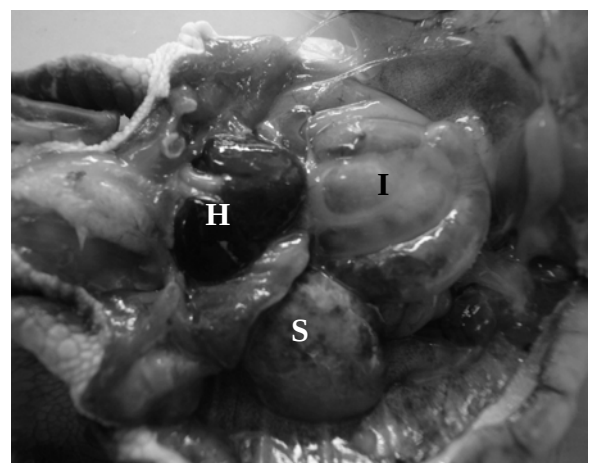
ค



ง



จ



ฉ

(คำบรรยายได้ภาพของรูปที่ 6 อยู่หน้าถัดไป)

รูปที่ 6 อวัยวะภายในและบาดแผลที่พบบนอวัยวะของลูกเต่าตนุ

(ก) อวัยวะภายในของลูกเต่าตนุอายุ 2 เดือน (H=หัวใจ; S=กระเพาะอาหาร; L=ตับ; I=ลำไส้เล็ก)
(ข) แผลเน่าที่บริเวณส่วนกันและหาง (หัวลูกศร) และบริเวณคืบหลังถูกลูกเต่าทะเลภายในบ่ออนุบาลเดียวกันกัดแหว่ง (ลูกศร) (ค) ลักษณะวงสีขาวยที่พบบนกระดองของลูกเต่า (วงกลม) (ง) แผลอักเสบภายในช่องปาก มีหนองสีเหลืองคล้ายเนยอยู่บริเวณบาดแผล (วงกลม) (จ) ลักษณะแผลที่ตับ อวัยวะมีลักษณะแข็งและมีสีเหลืองปนเขียว ซึ่งในตัวอย่างลูกเต่านี้พบว่าการลามของโรคไปยังลำไส้เล็กบริเวณที่อยู่ติดอยู่ตับ (ลูกศร) (ในภาพ L=ตับ; H=หัวใจ; S=กระเพาะอาหาร; I=ลำไส้เล็ก) (ฉ) ลักษณะผิดปกติของกระเพาะอาหาร พบว่าอวัยวะมีของเหลวสีเหลืองและแก๊สอัดแน่นอยู่ภายใน (S) โดยโรคมีการลามไปยังลำไส้เล็ก (I) ซึ่งมีลักษณะอาการเหมือนกัน

- กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrextasis) บางครั้งมีของเหลวสีเหลืองพร้อมแก๊สอยู่ภายใน (รูปที่ 6 ฉ)

- ลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง ลักษณะมีของเหลวสีเหลืองและแก๊สอัดแน่นอยู่ในภายในลำไส้ในบางครั้งพบอาการต่อเนื่องมาจากกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ลูกเต่าทะเลบางตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติที่ตับโดยตับมีลักษณะแข็งและมีสีเหลืองปนเขียวนั้นจะมีการลามของโรคไปยังลำไส้เล็กส่วนที่อยู่ติดกับอวัยวะตับอีกด้วย ลำไส้ส่วนนี้จะมีลักษณะแข็งและมีสิ่งอุดตันแน่นอยู่ภายใน (รูปที่ 6 ค)

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่พบอาการของโรคต่างๆ ซึ่งจะเห็นว่าอาการอักเสบช่องปากเป็นหนองและลักษณะผิดปกติที่ตับนั้นมีจำนวนสูงมากกว่าโรคอื่นๆ เป็นที่น่าสนใจว่าอัตราส่วนของโรคที่เกิดในลูกเต่าในแต่ละปีจะแตกต่างกันไป เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ของลูกเต่าที่มีอาการผิดปกติเหล่านี้ถูกเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาโดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา และการย้อมเนื้อเยื่อต่อไป

ตารางที่ 3 สรุปจำนวนตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติและโรคในลูกเต่าตนุและกระดองจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จากจำนวนทั้งหมด 65 ตัวอย่าง ระหว่างปีพ.ศ. 2548 ถึง พ.ศ. 2550

อวัยวะและลักษณะอาการที่พบ	จำนวนลูกเต่าที่พบอาการ/จำนวนลูกเต่าที่ตรวจสอบทั้งหมด			
	2548	2549	2550	Total
Ulcerative stomatitis	9/20 (45%)	6/20 (30%)	4/25 (16%)	19/65 (29.23%)
Ulcerative stomatitis + ulcerative shell	-	2/20 (10%)	-	2/65 (3.08%)
Ulcerative stomatitis + traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	2/20 (10%)	-	2/65 (3.08%)
Ulcerative stomatitis + gastrectasis	-	1/20 (5%)	-	1/65 (1.54%)
Ulcerative stomatitis + necrotizing hepatitis	4/20 (20%)	-	4/25 (16%)	8/65 (12.31%)
Ulcerative stomatitis + traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	-	1/25 (4%)	1/65 (1.54%)
+ necrotizing hepatitis				
Necrotizing hepatitis	3/20 (15%)	1/20 (5%)	6/25 (24%)	10/65 (15.38%)
Necrotizing hepatitis + enteritis or impacted intestine	-	2/20 (10%)	1/25 (4%)	3/65 (4.62%)
Necrotizing hepatitis + traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	-	1/25 (4%)	1/65 (1.54%)
Traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	3/20 (15%)	1/25 (4%)	4/65 (6.15%)
Enteritis or impacted intestine	-	-	2/25 (8%)	2/65 (3.08%)
No traumatic observed	4/20 (20%)	3/20 (15%)	5/25 (20%)	12/65 (18.46%)